

Immunosuppressive and antiproteolytic therapy in vascular diseases

Citation for published version (APA):

Bai, L. (2010). *Immunosuppressive and antiproteolytic therapy in vascular diseases*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20100310lb>

Document status and date:

Published: 01/01/2010

DOI:

[10.26481/dis.20100310lb](https://doi.org/10.26481/dis.20100310lb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Inflammation and extracellular matrix (ECM) remodeling are common features of several vascular diseases such as atherosclerosis, aortic aneurysm formation and vessel remodeling. Inflammatory cells are present in various stages of vascular diseases and can secrete proteolytic enzymes that contribute to ECM degradation and therefore vascular remodeling. This suggests that inflammation and ECM degradation act not in an independent manner but in mutual interaction and are linked at multiple levels in these vascular diseases. In this thesis, we investigated two hypotheses on the therapeutic potential of immunosuppressive and anti-proteolytic therapy in several vascular diseases. Firstly, as the calcineurin-NFAT signaling pathway was seen to be essential for an adequate immune response, we argued that inhibition of this pathway will protect against the aforementioned vascular diseases. Secondly, proteolytic arterial remodelling is a key process in aneurysm formation, atherosclerosis and neointima formation, therefore we hypothesized that inhibition of a key protease, cathepsin K, will protect against several vascular diseases that are characterized by excessive ECM remodeling.

Chapter 2 provides an update of current literature on the potential of immunomodulatory drugs as therapeutic modality for cardiovascular disease. After a short overview of the specific inflammatory pathways involved in atherosclerosis, we have reviewed the perspectives of several immunosuppressive drugs that are currently used for the prevention of (organ) transplant rejection (e.g. FK506, sirolimus, cyclosporine A and mycophenolate mofetil), for treatment of (clinical) atherosclerosis.

FK506 is a widely used immunosuppressive drug that inhibits the calcineurin-NFAT signaling pathway. Whereas we have previously shown that low-dose treatment with FK506 attenuated the progression of murine atherosclerosis, other studies in cholesterol-fed rabbits reported that high dose FK506 treatment deteriorated atherosclerosis. In **chapter 3**, we therefore hypothesized that the dosage of FK506 is critical for its effects in the initiation of atherosclerosis. This led us to investigate dose-dependent effects of FK506 in our mouse model of collar-induced atherosclerosis. Unlike low-dose FK506, high-dose FK506 did not protect against atherosclerosis. We provide evidence for a dose dependent effect of FK506 on peripheral immune activity. Cytokine analysis of conditioned media of CD4⁺ T cells isolated from FK506-treated mice revealed that low-

Summary

dose FK506 significantly increased the IL-4/IFN- γ and IL-10/IFN- γ ratio suggestive of moderate Th2 skewing, whereas high-dose treatment decreased this ratio. These results unveil dosage as a critical factor in the effects of FK506 on atherosclerosis, probably by differentially skewing the Th1/Th2 balance.

An aneurysm is a permanent pathological dilation of the arterial wall, and is prone to rupture. Inflammatory processes play a significant role in abdominal aortic aneurysm (AAA) formation. Given the inflammatory features of AAA and the potential immunosuppressive effect of low-dose FK506, we hypothesized that low-dose FK506 treatment could decrease AAA formation. In **chapter 4**, we describe the effect of low-dose FK506 treatment on angiotensin II (Ang II)-induced aneurysm formation in the abdominal aorta of apoE^{-/-} mice. Contrary to our expectations, FK506 treatment did not protect against murine AAA formation. The distinct underlying pathophysiology of atherosclerosis and aneurysm formation might explain the differential effect of low-dose FK506 in these vascular pathologies.

As intervention in the calcineurin-NFAT pathway by low-dose FK506 treatment was shown to be atheroprotective, we further investigated the effect of a deficiency of one of the potential FK506 targets, NFATC2, in the hematopoietic lineage on atherosclerosis in **chapter 5**. Surprisingly, NFATC2 deficiency in haematopoietic cells resulted in more advanced lesion development and CD3⁺ T cell content was sharply increased in NFATC2^{-/-} plaques. We found that NFATC2 deficiency result in an enhanced rather than compromised immune response in that NFATC2 deficient T cells had enhanced proliferative activity, displayed a memory/activated T cell phenotype, and had robust migration capacity to atherosclerotic lesions. These findings suggest that NFATC2 deficiency enhances immune responses critical for atherosclerosis progression.

Chapter 6 presents a literature review on the role of cathepsins in vascular remodeling and atherosclerosis.

In **chapter 7**, we focused on the effect of lysosomal cysteine protease-cathepsin K (catK) in AAA. CatK exerts strong elastinolytic and collagenolytic activity and is implicated in a wide range of pathological disorders including cardiovascular diseases. CatK expression was found to be elevated in human aortic aneurysm pointing to a role in this vascular disease. Conceivably a deficiency of catK could decrease aneurysm formation. To test this hypothesis, we investigated the effect of catK deficiency on Ang II-induced aneurysm formation in the abdominal aorta of apoE^{-/-} mice. Much to our surprise, catK deficiency did not protect against murine aneurysm formation, nor did it affect medial

elastin breaks. Proteolytic activity in abdominal aortic lysates was comparable between apoE^{-/-} and catK^{-/-}/apoE^{-/-} mice. Adventitial presence of catS and catC-expressing cells was significantly increased in catK^{-/-}/apoE^{-/-} versus apoE^{-/-} mice, which might have compensated for the deficiency of catK-derived proteolysis in the aneurysm tissue of catK deficient apoE^{-/-} mice. Moreover, circulating granulocyte and activated T cell numbers were significantly increased in Ang II-infused catK^{-/-}/apoE^{-/-} mice compared to apoE^{-/-} mice. In conclusion, the finding that catK deficiency did not protect against aneurysm formation is remarkable given the previously reported unfavorable effects of this protease in atherosclerosis and once again underpins the fundamental differences in the proteolytic processes that underlie AAA and atherosclerosis.

This finding has prompted to a study of the role of catK in another vessel wall pathology, flow cessation-elicited carotid artery remodeling, under conditions of normo- (wild type/WT mice) and of hyperlipidemia (apoE^{-/-} mice) (**chapter 8**). Surprisingly, catK deficiency completely blunted the augmented hyperplastic response to flow cessation in apoE^{-/-} (macrophage-rich lesions), while having no effect at all on vascular remodelling in WT mice. Interestingly, catK deficiency significantly reduced circulating CD3 T-cell numbers, but increased the regulatory T cell subset in apoE^{-/-} but not WT mice. In addition, apoE^{-/-} hyperplastic remodeling was characterized by significantly enhanced number of circulating natural killer cells and reduced numbers of regulatory T cells in spleen compared to WT mice. Furthermore, catK deficiency tended to bias macrophage polarization towards an M2a phenotype, which is instrumental in wound healing responses. Therefore, catK deficiency almost completely blunted the increased vascular remodeling response of apoE^{-/-} mice to flow cessation, possibly by correcting hyperlipidemia-associated pro-inflammatory effects on peripheral immune response.

In **chapter 9**, the findings and implications of the results presented in this thesis are discussed in relation to the available literature.

Inflammatory processes and vascular remodeling are common features of several vascular pathologies such as atherosclerosis and aneurysm formation. Nevertheless, an immunosuppressive therapy only protected against atherosclerosis formation and was completely ineffective in aneurysm formation. Likewise, catK deficiency protected against macrophage-rich lesion formation but not macrophage-poor lesion and aneurysm formation, suggesting that although inflammatory and proteolytic pathways contribute to all of the aforementioned pathologies, immunosuppressive or anti-proteolytic therapy are not equally effective. While immunosuppressive agents are widely used in clinical practice to improve survival of transplanted organs, several side effects

Summary

and a toxic profile that is related to calcineurin inhibition, limit their use. Alternative solutions for immunosuppressive therapy in the treatment of vascular pathologies include refinement/optimization of the dosage, disease-specific interventions and novel small-peptide inhibitors that more specifically interfere with the calcineurin/NFAT pathway. Interventions in proteolytic pathways are also promising for the treatment of atherosclerosis. The recent discovery of the involvement of catK in atherosclerosis and neointima formation warrants further investigation of the therapeutic potential of catK inhibitors in these vascular pathologies. The most promising therapy should specifically target the key component of the signaling pathway that contributes to disease progression without the potential side effects.

Nederlandse samenvatting

(Dutch summary)

Verschillende aandoeningen van de grote vaten zoals aderverkalking (atherosclerose), verwijding van de grote buikslagader (aneurysma vorming) en structuurveranderingen van de vaatwand (vaatwand-remodelering) tijdens neointima vorming, worden gekenmerkt door ontstekingsprocessen en veranderingen in het bindweefsel, ook wel de extracellulaire matrix (ECM) genoemd. Deze ontstekingsprocessen en veranderingen in de ECM zijn bovendien onderling aan elkaar gerelateerd, aangezien ontstekingscellen enzymen (proteases) kunnen uitscheiden die de ECM kunnen afbreken. In dit proefschrift werden 2 hypothesen onderzocht. De eerste hypothese richtte zich op het afremmen van de ontstekingsreactie. Calcineurine en NFAT zijn belangrijke moleculen in de ontstekingsreactie. Onze veronderstelling was dat remming van deze moleculen beschermend zou werken tegen atherosclerose en aneurysma vorming. De tweede onderzoeksvraag betrof een belangrijke protease, cathepsine K, die betrokken zou zijn bij verschillende aandoeningen van de grote vaten. Onze hypothese was dat remming van cathepsine K zou beschermen tegen vaataandoeningen die gepaard gaan met veranderingen in de ECM, zoals aneurysma en vaatwand-remodelering.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de huidige literatuur over het gebruik van ontstekingsremmers bij de bestrijding van vaataandoeningen. Deze immunosuppressiva, zoals FK506, sirolimus en cyclosporine A worden nu met name gebruikt om afstoting tegen te gaan na orgaantransplantatie.

FK506 is een veelgebruikt immunosuppressivum dat aangrijpt op de eerder genoemde moleculen calcineurine en NFAT. Hoewel we eerder hebben aangetoond dat een lage dosis FK506 de progressie van atherosclerose in muizen verlaagde, liet een studie in konijnen zien dat FK506 de ontwikkeling van atherosclerose juist verergerde. In deze konijnenstudie werd echter een relatief hoge dosis FK506 toegediend. In **hoofdstuk 3** hebben we onderzocht in hoeverre de dosis een kritische factor is, in het effect van FK506 op de ontwikkeling van atherosclerose. In een muis model van atherosclerose (apoE deficiënte muizen) zijn de dosisafhankelijke effecten van FK506 vervolgens bestudeerd. In tegenstelling tot een lage dosis FK506, beschermde een hoge dosis FK506 niet tegen de ontwikkeling van atherosclerose. Verdere analyse in celkweken, met geïsoleerde (CD4-positieve) T cellen uit FK506 behandelde muizen, toonde aan dat een

lage dosis FK506 secretie van bepaalde ontstekingsmediatoren (cytokines) die wijzen op een ontstekingsremmende werking (Th2 respons) significant verhoogde, terwijl een hoge dosis FK506 juist zorgde voor ontstekingsbevorderend effect (Th1 respons). Deze resultaten tonen aan dat de dosering een kritische factor is bij de effecten van FK506 behandeling van atherosclerose, en dat de Th1/Th2 balans hier mogelijk een belangrijke rol in speelt.

Een aorta aneurysma is een verwijding van de vaatwand van een slagader. Het is aangetoond dat ontstekingsprocessen een cruciale rol spelen in de ontwikkeling van een aneurysma van de grote buikslagader, ook wel een abdominaal aorta aneurysma (AAA) genoemd. Gezien het feit dat ontsteking een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van AAA en dat een lage dosis FK506 de ontstekingsactiviteit onderdrukt, stelden we de hypothese dat een lage dosis FK506 de ontwikkeling van een AAA voorkomt. In **hoofdstuk 4** wordt het effect van een lage dosis FK506 beschreven in de ontwikkeling van aneurysma's in een muismodel. In dit model ontstaat door een continue infusie van het molecuul angiotensine II (Ang II) een aneurysma in de abdominale aorta van apoE deficiënte muizen. In tegenstelling tot onze verwachtingen beschermde FK506 niet tegen AAA vorming in deze muizen. De aard van de ontstekingsmechanismen van atherosclerose en aneurysma zijn blijkbaar verschillend, met als gevolg dat FK506 geen effect heeft op de ontwikkeling van aneurysma's in ons muismodel.

Zoals eerder vermeld in hoofdstuk 3, verminderde een lage dosis FK506 de ontwikkeling van atherosclerose. In **hoofdstuk 5** hebben we in meer detail onderzocht of de beschermende werking van FK506 terug te voeren is op een remming van NFATc2, één van de aangrijpingspunten van dit immunosuppressivum. Hierbij werd gebruik gemaakt van NFATC2 deficiënte muizen; de beenmergcellen van deze muizen zijn daarbij getransplanteerd in atherosclerotische muizen, waarna de effecten op het ontstaan van atherosclerose zijn bestudeerd. Onze hypothese was dat de afwezigheid van NFATC2 in, van het beenmerg afkomstige ontstekingscellen, zou beschermen tegen het ontstaan van atherosclerose. In tegenstelling tot onze verwachtingen, leidde NFATC2 deficiëntie tot ontwikkeling van grote gecompliceerde atherosclerotische lesies, met een verhoogd aantal (CD3-positieve) T cellen. Bovendien leidde NFATC2 deficiëntie tot een verstoorde algehele ontstekingsactiviteit. NFATC2 deficiënte T cellen waren actiever en vertoonden zowel een verhoogde celdeling als een verhoogde bewegingsactiviteit (verhoogde T cel migratie) richting de atherosclerotische lesie. Deze bevindingen suggereren dat NFATC2 deficiëntie bijdraagt aan de verdere progressie van atherosclerose door een verhoging van de ontstekingsactiviteit.

In **hoofdstuk 6** wordt een overzicht gegeven van de huidige literatuur over de rol van cathepsines in het herstructureren van de vaatwand (vasculaire remodelering) en atherosclerose.

In **hoofdstuk 7** bestuderen we het effect de protease cathepsin K in AAA. Cathepsine K kan de ECM componenten elastine en collageen zeer efficiënt afbreken. Onderzoek heeft aangetoond dat cathepsine K verhoogd aanwezig is in humane AAA, wat suggereert dat cathepsine K een rol speelt in deze aandoening. Onze hypothese was dat afwezigheid van cathepsine K, aneurysma vorming zal verminderen. Om dit te testen werd het in hoofdstuk 4 beschreven model gebruikt, waarin met behulp van een continue Ang II infusie een aneurysma van de buikslagader is opgewekt in muizen met een deficiëntie in cathepsine K en apoE. In tegenstelling tot onze verwachtingen, beschermde cathepsine K deficiëntie niet tegen aneurysma vorming in deze muizen. Nader onderzoek van het aneurysma weefsel toonde aan dat het vermogen om ECM componenten af te breken vergelijkbaar was in cathepsine K deficiënte en controle muizen. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door de verhoogde aanwezigheid van 2 vergelijkbare cathepsines: er werden namelijk meer cathepsine S- en C-positieve cellen gevonden in het aneurysma weefsel van de cathepsine K deficiënte muizen. Bovendien was de algehele ontstekingsactiviteit in de cathepsine K deficiënte muizen duidelijk verhoogd na Ang II infusie (meer granulocyten en geactiveerde T-cellen aanwezig in de bloedbaan). Concluderend kan gesteld worden dat afwezigheid van cathepsine K wel de ontwikkeling van atherosclerose kan remmen, maar geen effect heeft op aneurysma vorming in muizen.

In **hoofdstuk 8** werd de rol van cathepsine K in structuurveranderingen van de vaatwand (vasculaire remodelering) verder bestudeerd. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een model waarin de bloedstroom van één van de halsslagaders van apoE deficiënte of controle muizen werd afgesloten. Hierdoor zal de vaatwand zich aanpassen; door ophoping van cellen in de vaatwand ontstaat een zogenaamde neointima en het vat zal structuurveranderingen ondergaan (vasculaire remodelering). In de apoE deficiënte muizen bestaat de neointima met name uit een bepaald type ontstekingscellen, de macrofagen, terwijl in de controle/wildtype muizen de neointima met name bestaat uit gladde spiercellen. Uit de resultaten bleek dat in afwezigheid van cathepsine K de vorming van de macrofaag-rijke neointima in de apoE deficiënte muizen volledig geremd is, terwijl dit totaal geen effect had op de vorming van de neointima in de controle/wildtype muizen. Bovendien was het aantal circulerende (CD3-positieve) T-cellen verminderd en het aantal regulatoire T-cellen verhoogd in cathepsine K deficiënte apoE^{-/-} muizen, maar niet in de controle/wildtype muizen. Verdere analyse

in celkweken van geïsoleerde macrofagen toonde aan dat cathepsine K deficiënte macrofagen in het algemeen een hogere ontstekingsremmende activiteit bezaten dan controle macrofagen (M2a fenotype). Uit deze bevindingen kan geconcludeerd worden dat de verhoogde vasculaire remodeleringscapaciteit, zoals waargenomen bij apoE deficiënte muizen, bijna volledig geremd is in afwezigheid van cathepsine K. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een correctie van de verhoogde ontstekingsactiviteit in apoE deficiënte muizen.

In **hoofdstuk 9** worden de bevindingen uit dit proefschrift bediscussieerd. Hoewel ontstekingsprocessen en vasculaire remodelering gemeenschappelijke kenmerken zijn van verscheidene vasculaire aandoeningen zoals atherosclerose en aneurysma vorming, stelden we vast dat een bepaalde ontstekingsremmende therapie alleen bescherming biedt tegen atherosclerose, maar niet effectief is tegen de ontwikkeling van een aneurysma. Ook bleek dat afwezigheid van de belangrijke protease cathepsine K beschermde tegen de vorming van een macrofaag-rijke neointima, maar niet tegen aneurysma vorming en het ontstaan van een gladde spiercelrijke neointima. Deze resultaten suggereren dat, hoewel ontstekingsprocessen en ECM afbraak onderdeel zijn van alle genoemde vaataandoeningen, een ontstekingsremmende therapie of een therapie gericht op voorkoming van ECM afbraak, niet even effectief was. Ondanks aanzienlijke bijwerkingen worden immunosuppressiva nog vaak toegepast/veel gebruikt in de klinische praktijk om orgaanafstoting tegen te gaan. Deze bijwerkingen staan een ruimer gebruik van deze geneesmiddelen in de weg. Er zijn echter wel experimentele ontwikkelingen die een meer specifieke remming van de betrokken moleculen mogelijk maakt. Dit opent perspectieven voor een aanpak, waarbij specifieke moleculen in bepaalde vaataandoeningen geremd kunnen worden en er minder risico is op bijwerkingen. Concluderend kan gesteld worden dat een ontstekingsremmende therapie of een therapie gericht op voorkoming van de ECM afbraak alleen effectief kan zijn als de therapie gericht ingrijpt op mechanismen die cruciaal zijn voor het ontstaan van de vasculaire aandoening.